

08/945459
PCT/JP96/01062

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

19.04.96

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1995年11月17日

REC'D 05 JUL 1996

WIPO PCT

出願番号
Application Number:

平成 7年特許願第322403号

出願人
Applicant(s):

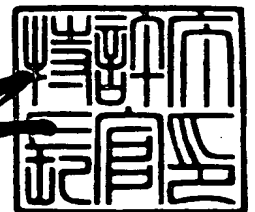
ヘキストジャパン株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1996年 6月19日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

清川 佑



出証番号 出証特平08-3039659

【書類名】 特許願

【整理番号】 DOJ-4889

【提出日】 平成 7年11月17日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 37/02
C12N 15/00

【発明の名称】 新規なタンパク質およびその製法

【請求項の数】 10

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県川越市南台1丁目3番地2 ヘキストジャパン株式会社医薬研究開発本部内

【氏名】 牧島 房夫

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県川越市南台1丁目3番地2 ヘキストジャパン株式会社医薬研究開発本部内

【氏名】 高松 宏行

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県川越市南台1丁目3番地2 ヘキストジャパン株式会社医薬研究開発本部内

【氏名】 三木 秀夫

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県川越市南台1丁目3番地2 ヘキストジャパン株式会社医薬研究開発本部内

【氏名】 河合 伸治

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県川越市南台1丁目3番地2 ヘキストジャパン株式会社医薬研究開発本部内

【氏名】 木村 道夫

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県川越市南台1丁目3番地2 ヘキストジャパン株式会社医薬研究開発本部内

【氏名】 松本 智明

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県川越市南台1丁目3番地2 ヘキストジャパン株式会社医薬研究開発本部内

【氏名】 勝浦 美枝子

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県川越市南台1丁目3番地2 ヘキストジャパン株式会社医薬研究開発本部内

【氏名】 榎本 耕一

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県川越市南台1丁目3番地2 ヘキストジャパン株式会社医薬研究開発本部内

【氏名】 佐藤 右典

【特許出願人】

【識別番号】 000113137

【氏名又は名称】 ヘキストジャパン株式会社

【代表者】 ルディガー・バート

【代理人】

【識別番号】 100091731

【弁理士】

【氏名又は名称】 高木 千嘉

【電話番号】 03-3261-2022

【代理人】

【識別番号】 100087930

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐藤 辰男

【代理人】

【識別番号】 100080355

【弁理士】

【氏名又は名称】 西村 公佑

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成 7年特許願第 93664号

【出願日】 平成 7年 4月19日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015565

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 受託証（写） 1

【包括委任状番号】 9103131

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規なタンパク質およびその製法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列表配列番号 1 記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

【請求項 2】 請求項 1 記載のタンパク質の二量体からなるタンパク質。

【請求項 3】 請求項 2 記載のタンパク質を有効成分とする軟骨、骨疾患治療剤。

【請求項 4】 軟骨、骨疾患が骨粗鬆症である請求項 3 記載の軟骨、骨疾患治療剤。

【請求項 5】 軟骨、骨疾患が変形性関節症または、骨関節炎である請求項 3 記載の軟骨、骨疾患治療剤。

【請求項 6】 軟骨、骨疾患が骨折である請求項 3 記載の軟骨、骨疾患治療剤。

【請求項 7】 軟骨、骨疾患が歯根・歯槽の欠損である請求項 3 記載の軟骨、骨疾患治療剤。

【請求項 8】 請求項 1 のタンパク質を発現しうる DNA 配列を含むプラスミドで形質転換した大腸菌を用いて請求項 1 のタンパク質を製造する方法。

【請求項 9】 配列表配列番号 1 記載のアミノ酸配列をコードする DNA 配列の 5 プライム末端にメチオニンをコードするコドンが付加した DNA を含有するプラスミドを構築することを特徴とする請求項 8 の製造方法。

【請求項 10】 配列表配列番号 1 記載のアミノ酸配列をコードする DNA 配列の 5 プライム末端にメチオニンをコードするコドンが付加した DNA を含有するプラスミドを構築し、そのプラスミドで大腸菌を形質転換し、その大腸菌を培養することによって得られるインクルージョンボディを可溶化し、精製することによって得られる単量体のタンパク質を二量体に再生し、これを精製することを特徴とする請求項 2 のタンパク質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、MP 5 2 由来の配列表配列番号 1 のアミノ酸配列を有するタンパク質に関する。また、本発明は前記タンパク質の二量体およびこの二量体タンパク質からなる軟骨、骨疾患治療剤に関する。また、本発明は上記タンパク質を発現しうる DNA 配列を含むプラスミドで形質転換した大腸菌を用いて上記タンパク質を大量かつ高純度で製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】

現在、骨疾患の予防ないしは治療剤としては、エストロゲン、カルシトニン、ビタミン D 3 とその誘導体およびビスホスホン酸誘導体などが知られている。また最近になって TGF- β ジーンスーパーファミリーに属する骨誘導因子 (Bone morphogenetic protein: 以降 BMP と呼ぶ) である BMP-2 から BMP-9 等の一連のタンパク質に骨誘導の作用のあることが報告されている。

さらに MP 5 2 と称されるタンパク質 (W0 93/16099 および W0 95/04819) に骨誘導の作用があることが報告されている。成熟型 MP 5 2 は N 末端にアラニンを有する 120 残基からなるタンパク質であると考えられており、そのアミノ酸配列はこれらの特許に記載されている。

また MP 5 2 とよく似たアミノ酸配列を有する GDF-5 と称されるマウス由来の蛋白質については Nature, vol.368, p.639-643 (1994年) および W0 94/15949 に記載されている。

しかしながら、これらのタンパク質を工業的な規模で純粋な形で製造することは容易ではない。

【0003】

MP 5 2 を遺伝子工学的に製造するに当たって L-細胞のような動物細胞を使うことが試みられた。しかし純粋な MP 5 2 を収率よく製造することは容易ではない。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、MP 5 2 を大腸菌を使って遺伝子工学的手法により大量に製造することを試みた。すなわちアラニンから始まる MP 5 2 をコードする DNA の

5プライム末端にメチオニンをコードするコドンが付加して大腸菌によってMP 52を製造することを試みた。その結果生産されるものはMP 52のみならずN末端にメチオニンを有する121残基のタンパク質、およびN末端のアラニンが脱落してプロリンから始まる119残基のタンパク質が生成しこの混合物からMP 52を純粋に分離することは極めて困難であった。

【0005】

本発明者は、MP 52のN末端のアラニンを削除した119残基よりなる配列表配列番号1のアミノ酸配列をコードするDNA配列の5プライム末端にメチオニンをコードするコドンを結合させたプラスミドを構築し、このプラスミドを導入した大腸菌を用いて発現させたところ、N末端がプロリンから始まる配列表配列番号1記載のタンパク質を選択的に極めて収率よく生産することを見出した。

しかも配列表配列番号1に記載したタンパク質の二量体は軟骨・骨誘導活性を有することを確認し、本発明を完成した。

【0006】

本発明は、配列表配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質に関する。このタンパク質は120残基からなる成熟型部分と見なされているヒトMP 52よりN末端のアラニンを削除した119残基のアミノ酸からなるタンパク質である。本発明により得られるタンパク質は水に可溶性である。さらに本発明のタンパク質はヒト由来であることを特徴とするため、それ自身の毒性は少ない。

【0007】

また本発明は、配列表配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質の二量体からなる軟骨および（または）骨疾患の治療剤に関する。より詳細には、本発明のタンパク質の二量体は軟骨・骨誘導活性を有するため、骨粗鬆症、先天性軟骨・骨疾患、変形性膝関節症・変形性股関節症等の変形性関節症または、骨関節炎、半月損傷等の軟骨損傷、外傷・腫瘍摘出等による骨・軟骨欠損部の再生、骨・軟骨欠損、骨折、軟骨形成不全症・軟骨発育不全症・軟骨無形成症・口蓋裂・骨形成不全症等の先天性軟骨・骨疾患、さらには、歯根・歯槽の欠損等の

予防および治療剤に関する。さらに本発明のタンパク質は軟骨・骨誘導活性を有するため美容外科の骨移植の治療等に用いることが出来る。これらの治療には、獣医外科領域のものも含まれる。

【0008】

本発明は、配列表配列番号1で示されるヒトMP52由来の119残基のアミノ酸からなるタンパク質を大腸菌を用いて製造する方法に関する。

さらに、本発明は配列表配列番号1で示されるヒトMP52由来の119残基のアミノ酸配列をコードするDNA配列の5プライム末端にメチオニンをコードするDNAを含有するプラスミドの構築に関する。ヒトMP52 cDNAは、W093/16099記載のcDNAを含んだプラスミドベクターを鋳型DNAとして、成熟型部分のみをポリメラーゼ連鎖反応（PCR法）を用いて増幅した。ここで用いるPCR法とは通常核酸DNAまたはRNAの微量断片を米国特許番号4,683,195に記載されている方法で増幅することを意味する。

【0009】

本発明のタンパク質を生産するために、このタンパク質をコードしているDNAを含んだ適切な発現ベクターを構築し、遺伝子工学の手法により好ましい大腸菌の宿主に導入する事が必要である。本発明のタンパク質を大量に生産するため以下の2つの改良方法を施した。1) 目的蛋白質の生産性を上げる方法：M. Nobuharaらが報告（Agric. Biol. Chem., 52(6), 1331~1338, 1988）している翻訳効率を上げる方法、即ち、開始コドンATG周辺のAT含量を上げる方法、および2) プラスミドの複製数を上げる方法、即ち複製オリジンをpBR系からpUC系に改変する方法。さらにプロモーター領域と配列表配列番号1のアミノ酸配列をコードするDNA配列とを直接つなぐことにより本発明の発現ベクター（pKOT245（受託番号微工研寄第P-14895号））を構築した。

【0010】

本発明は、配列表配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列の5プライム末端にメチオニンをコードするコドンが付加したDNAを含有するプラスミドを構築し、そのプラスミドで大腸菌を形質転換し、その大腸菌を培養することによって得られるインクルージョンボディを可溶化し、精製することによ

って得られる単量体のタンパク質、およびこれを再生、精製することによって得られる配列表配列番号1のタンパク質の二量体のタンパク質の製造方法に関する。すなわち、本発明のタンパク質は大腸菌インクルージョンボディを可溶化した後、SP-Sepharose、FFカラムおよびSephacryl S-200カラムにより単一なスルホン化MP52単量体を得た。それからリフォールディングを行った後逆相HPLCのRESOURCE RPCカラム、Sephacryl S-200カラム及び再度逆相HPLCのRESOURCE RPCカラムを通すことにより本タンパク質の精製二量体画分を得た。得られた本タンパク質の物理化学的性質はN末端アミノ酸配列、アミノ酸組成および電気泳動による分析で解析した。

【0011】

本発明は、さらに本発明の発現ベクターを組み込んだ大腸菌の培養を培養液の温度28℃～34℃、pH6～8、溶存酸素濃度20～50%の条件下で行う製造方法に関する。

本発明のタンパク質の二量体の生物学的活性は異所性軟骨・骨形成（エクトピックボーンフォーメーション）の軟X線写真撮影解析及び組織学的解析により評価した。

【0012】

全身投与方法としては静脈内、筋肉内および腹腔内投与が可能であり、静脈内投与の場合は通常の静脈内注射の他点滴静注が可能である。

注射用製剤としては、例えば注射用粉末製剤とすることができる。その場合は適当な水溶性賦形剤、例えばマンニトール、ショ糖、乳糖、マルトース、ブドウ糖、フルクトース等の一種または2種以上を加えて水で溶解し、バイアルまたはアンプルに分注した後、凍結乾燥し密封して製剤とすることができる。

【0013】

局所投与方法としては、その部位の軟骨・骨あるいは歯の表面をコラーゲンペースト、フィブリンのりまたは他の接着剤を用いて本タンパク質で覆う方法がある。これらのうち骨移植に用いる骨は天然骨の他、従来用いられる人工骨にも利用できる。人工骨とは金属、セラミックス、ガラス等の天然素材または人工無機質素材で出来た骨を意味する。人工無機質素材として好ましくはハイドロキシア

パタイトがあげられる。例えば、人工骨の内部材料に金属そしてその外側の材料にハイドロキシアパタイトを使用する。さらに、本タンパク質は骨再構築を促進するために癌性骨組織にも投与出来、また、軟骨移植にも利用可能である。

【0014】

投与量については、本タンパク質の作用に影響する様々な要因、たとえば、形成が望まれる骨・軟骨の重量、骨・軟骨損傷の部位及びその状態、患者の年齢、性別、感染の重症度、投与時間および他の臨床要因を考慮して担当医が決定する。また、用量は本タンパク質との再構成に用いる担体の種類によって変動し得る。一般的に、投与量は、支持体との組成物として使用するとき、所望の骨・軟骨湿重量当たり、本タンパク質約 $10 \sim 10^6$ ナノグラム、注射剤として局所及び全身性に適用するとき、患者1人当たり $0.1 \sim 10^4$ マイクログラムを一週間に一度から一日に一度の頻度で投与することが好ましい。

【0015】

骨・軟骨再生に対して既知の成長因子例えばinsulin-like growth factor-I (IGF-I)等を同時適用することにより相乗効果が期待できる。

このように本発明のタンパク質を工業的な規模でしかも純粋な形で製造する方法は今まで報告されておらず、軟骨・骨誘導活性を有する軟骨、骨疾患治療剤として有効である。

【0016】

【実施例】

次に、実施例を示して本発明の効果を具体的に説明する。なお、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

【0017】

実施例1 ベクターの作製

(1) 変異型MP52成熟型部分の単離

ヒトMP52 cDNAは、W093/16099に記載されたcDNAを含んだプラスミドベクター(pSK52s)を鋳型DNAとして、成熟型部分のみをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて増幅した。

開始コドンATG周辺のAT含量を上げる事により、目的タンパク質の生産性

を上げる方法 {M. Nobuharaらの報告 (Agric. Biol. Chem., 52(6), 1331~1338, 1988)} に従い成熟型のMP 52 遺伝子の一部のDNAを置換した。

置換の方法は、配列番号2の順方向PCRプライマーを用い、PCR法で行った。PCRプライマーのDNA配列は、順方向プライマーとして配列番号2、及び逆方向プライマーとして配列番号3記載のDNAを用いた。

PCRは、同じ試験管中で、鋳型DNA (10ナノグラム)、順方向及び逆方向PCRプライマー各々50ピコモル、dNTP (0.2ミリモル)、及びMgCl₂ (1.5ミリモル) をTaq DNAポリメラーゼ (5U) と共に加えることにより行った。

各サイクルが、変性 (94℃、1分間)、プライマーアニーリング (55℃、1分間)、およびプライマー伸長 (72℃、2分間) からなる30サイクルのPCRを行った (以下のPCRはすべてこの条件で行った)。

PCR反応からの生成物を1.5%低融点アガロース (FMC社) 中で電気泳動により分離し、配列番号1のアミノ酸配列に相当する約360bpからなるDNAを切り出した (これをフラグメント1とする)。

【0018】

(2) 本タンパク質の大腸菌発現ベクターの構築

プラスミドの複製数を上げるためには、複製オリジンをpBR系からpUC系に改変した。市販の大腸菌発現ベクターpKK223-3 (ファルマシア・バイオテク株式会社より購入) のtacプロモーター領域を制限酵素SspIとEcoRIで消化後、Mung Bean Nuclease (宝酒造株式会社、カタログ番号2420A) で処理し、フラグメント1の開始コドン側にT4 DNA Ligase (宝酒造株式会社、カタログ番号2011A) で結合させ、pKK223-3のrrnBT₁T₂ターミネーター領域を制限酵素SalIとSspIで消化し、SalIで消化したフラグメント1の終止コドン側に結合させ、pUC18のSmaI部位に組み込むことにより、本タンパク質の生産のための発現ベクター {pKOT245 (受託番号微工研寄第P-14895号)} (図1) を構築した。pKOT245のDNAの長さは3.7kbである。作製した本発明のタンパク質発現ベクターは、Pharmacia ALF DNA シークエンサーによりその塩基配列の決定を行った。

(3) 形質転換

形質転換は、Kushnerらの塩化ルビジウム法 (Genetic Engineering, p.17, Elsevier (1978)) に従った。即ち、pKOT245を宿主大腸菌W3110Mへ上記の手法に従い移入し、本発明のタンパク質生産大腸菌とした。

【0019】

実施例2 培養

(1) 培養

本発明のタンパク質発現大腸菌を改変SOC培地 (Bacto tryptone 20 g/l, Bacto yeast extract 5 g/l, NaCl 0.5 g/l, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.03 g/l, Glucose 3.6 g/l) で前培養し、生産用培地 (Bacto tryptone 5 g/l, Citric acid 4.3 g/l, K_2HPO_4 4.675 g/l, KH_2PO_4 1.275 g/l, NaCl 0.865 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100mg/l, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/l, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{nH}_2\text{O}$ 0.5mg/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 mg/l, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.225mg/l, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0.1mg/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.25mg/l, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 6 mg/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.2 g/l, Thiamine HCl 5.0mg/l, Glucose 3 g/l) 5 Lに対し菌体懸濁液を100 ml添加し、10 Lの培養槽で通気攪拌しながら培養し、対数増殖前期 ($\text{OD}_{550}=5.0$) に達した段階で1 mMの濃度でイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシドを添加し、さらに OD_{550} が150に達するまで培養した。培養中、温度は32℃、pHはアンモニアを添加することにより7.15に制御し、溶存酸素濃度の低下を防ぐために攪拌速度をあげることで空気が飽和の50%に溶存酸素濃度を制御した。また、高菌体濃度とするために溶存酸素濃度の急激な上昇を指標として、50%グルコース溶液を0.2%濃度で添加しながら培養した。

(2) 大腸菌インクルージョンボディの調製

上記方法により得られた培養液を遠心して菌体を回収し、10 mMエチレンジアミン四酢酸を含む25 mM Tris-HCl緩衝液を (pH7.3) に懸濁し菌体破碎装置 (ゴーリン社製) を用いて細菌を破碎し、再度遠心してインクルージョンボディを含む沈殿を回収した。

【0020】

実施例3 精製

(1) 大腸菌インクルージョンボディの可溶化

大腸菌インクルージョンボディを1% Triton X-100で3回洗浄後、3000×gで30分間、4℃で遠心し、得られた沈殿を20mM Tris-HCl緩衝液、pH8.3、8M尿素、10mM DTT、1mM EDTAで超音波をかけながら可溶化した。

(2) 単量体精製

その可溶化液を20000×gで30分間、4℃で遠心し、その上清を回収した。得られた上清を20mM Tris-HCl緩衝液pH8.3、6M尿素、1mM EDTAで平衡化したSP-Sepharose FF（ファルマシア社）に通し、同溶液で洗浄後、0.5M食塩を含む同溶液で溶出させた。溶出液に Na_2SO_3 と $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ をそれぞれ最終濃度が111mM、13mMになるように加え4℃、15時間スルホン化を行った。スルホン化溶液を20mM Tris-HCl緩衝液、pH8.3、6M尿素、0.2M食塩、1mM EDTAで平衡化したSephacryl S-200（ファルマシア社）でゲル濾過を行い、単一なスルホン化された本発明のタンパク質単量体を得た。

【0021】

(3) リフォールディング

スルホン化された本発明のタンパク質単量体の溶液に9倍量の50mM Na-Glycine緩衝液pH9.8、1M塩化ナトリウム、30mM CHAPS、5mM EDTA、2mM GSH（還元型グルタチオン）、1mM GSSG（酸化型グルタチオン）を加えた後、3日間、4℃で攪拌しリフォールディングを行った。

(4) 二量体精製

リフォールディングされた試料を0.05% TFA、25%アセトニトリルで平衡化しておいた逆相HPLCのRESOURCE RPCカラム（ファルマシア社）に通し、0.05% TFA、25～45%アセトニトリルグラジェントにより溶出した。溶出液は吸光度計を用い280nmの吸光度によりモニターした。MP52二量体画分を回収し、凍結乾燥した。これを20mM Tris-リン酸緩衝液、pH8.0、8M尿素、1M食塩で平衡化しておいたSephacryl S-200でゲル濾過を行った後、本発明のタンパク質二量体画分を上述と同様の条件で逆相HPLC

のRESOURCE RPCカラムに通し精製された本発明のタンパク質二量体画分を得た。

【0022】

(5) 精製された本発明のタンパク質の物理化学的性質の測定

(ア) N末端アミノ酸配列分析

上記で得られた精製された本発明のタンパク質につき、N末端アミノ酸配列をアミノ酸シーケンサー、モデル476A（アプライドバイオシステムズ社）により分析したところ、配列表配列番号1で示すN末端から30番目までのアミノ酸配列が確認された。

(イ) アミノ酸組成分析

上記で得られた精製された本発明のタンパク質のアミノ酸組成をアミノ酸分析機[PICO TAGシステム(ウォーターズ社)]により調べた。その結果を表1に示す。表に示された数は1モノマー当りのアミノ酸残基数を示す。

【表1】

アミノ酸	実 測 値	期 待 値
A s x	11.5	12
G l x	10.9	11
S e r	8.4	9
G l y	4.3	4
H i s	4.0	4
A r g	7.7	7
T h r	5.4	6
A l a	7.3	7
P r o	10.2	10
T y r	2.9	3
V a l	5.7	7
M e t	5.1	4
$1/2$ C y s	2.6	7
I l e	4.9	6
L e u	10.0	10
P h e	4.0	4
L y s	5.9	6
T r p	—	2
配列の長さ		119

—：検出不可能

(ウ) 電気泳動による分析

上記で得られた精製された本発明のタンパク質の分子量を非還元条件下のSDS-PAGEにより確認したところ、約28kDaの分子量を示した。

上記(ア)、(イ)および(ウ)に示された結果より、本発明のタンパク質はN末端が単一にProから始まる119残基からなるタンパク質であることが解った。

【0023】

実施例4 生物学的活性の測定

(1) 実施例3により得られたタンパク質約500 μ gを10mM塩酸50 μ lに溶解、同溶媒で希釈し、1 μ g/10 μ l、10 μ g/10 μ l、および100 μ g/10 μ lの濃度の溶液を調製し、その10 μ lを豚腱由来type-Iコラーゲン溶液150 μ l(高研、0.5%、pH3、I-AC)と混和し、中和した後、凍結乾燥し、得られた混和物を8週令の雄性ICRマウスの大腿筋内に埋め込み、21日後に大腿部を摘出し、皮膚を剥離した後、軟X線写真撮影により、骨・軟骨石灰化組織の発現率を検討した。表2にその結果を示す。1 μ g/部位以上の用量においてその発現を認め、10 μ g/部位以上の用量において用いられたマウス全例にその発現を認めた。

【表2】

MP52タンパク質の用量	*骨・軟骨石灰化組織の発現率
対 照 (type-I コラーゲン単独)	0 / 4
1 μ g / 部位	3 / 4
10 μ g / 部位	4 / 4
100 μ g / 部位	4 / 4

*各群4例における実験の骨・軟骨石灰化組織の軟X線写真撮影解析による発現率を示す。

また、図2に各用量における典型的な骨・軟骨石灰化組織の軟X線写真像を示す。図2において、AはMP52タンパク質1 μ g/部位、BはMP52タンパク質10 μ g/部位、CはMPタンパク質100 μ g/部位の用量でそれぞれMP52タンパク質をマウス大腿筋肉に埋め込んだ例の結果を示す。この結果より

、用量依存的な骨・軟骨石灰化組織の増加が認められた。さらにこれらマウスの大腿部を、固定後、非脱灰切片を作成し、フォンコッサ (v n Kossa) 染色、アルシアンブルー (Alcian blue) 染色、及びヘマトキシリン-エオシン (Hematoxylin-eosin) 染色をそれぞれ実施した。

図3に、本タンパク質10 μ g/部位の用量においてtype-I コラーゲンとともに埋め込まれた標本の組織染色の顕微鏡写真を示す。図3において、Aはフォンコッサ染色、Bはアルシアンブルー染色、Cはヘマトキシリン-エオシン染色をそれぞれ示す。

図3(A)において、矢印ctの部分は石灰化組織を示し、矢印ccの部分は石灰化軟骨細胞を示す。図3(B)において、矢印rcの部分は残存軟骨組織を示す。図3(C)において、矢印ad部分は脂肪細胞、矢印bm部分は骨髄細胞、矢印lb部分は層板骨、矢印ob部分は骨芽細胞、矢印wb部分は線維性骨をそれぞれ示す。図3から、MP52タンパク質の投与により、骨芽細胞、骨髄細胞、石灰化軟骨細胞が生成し、骨・軟骨石灰化組織が形成されることが明らかである。

実施例4の結果から、本発明のタンパク質の二量体は、軟骨・骨誘導作用を有することが明らかとなった。

【0024】

【発明の効果】

配列表配列番号1記載のアミノ酸配列を有するタンパク質の二量体からなるタンパク質は軟骨・骨誘導活性を有し、軟骨、骨疾患の治療剤として有用である。さらに本発明のタンパク質の発現ベクターを改変することにより大腸菌を用いた遺伝子工学の手法により工業的な規模で純粋な形で該タンパク質を製造することが可能である。

【0025】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：119

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直線状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：N末端フラグメント

起源：

生物名：ヒト (homo sapiens)

組織の種類：ヒト胎児

配列の特徴：

存在位置：

他の情報：MP 52 アミノ酸配列の383番目から501番目のアミノ酸配列

配列：

CCA CTG GCC ACT CGC CAG GGC AAG CGA CCC AGC AAG AAC CTT AAG GCT 48

Pro Leu Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala

5

10

15

CGC TGC AGT CGG AAG GCA CTG CAT GTC AAC TTC AAG GAC ATG GGC TGG 96

Arg Cys Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp

20

25

30

GAC GAC TGG ATC ATC GCA CCC CTT GAG TAC GAG GCT TTC CAC TGC GAG 144

Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu

35

40

45

GGG CTG TGC GAG TTC CCA TTG CGC TCC CAC CTG GAG CCC ACG AAT CAT 192

Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His

50

55

60

GCA GTC ATC CAG ACC CTG ATG AAC TCC ATG GAC CCC GAG TCC ACA CCA 240

Ala Val Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr Pr
 65 70 75 80
 CCC ACC TGC TGT GTG CCC ACG CGA CTG AGT CCC ATC AGC ATC CTC TTC 288
 Pro Thr Cys Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Phe
 85 90 95
 ATT GAC TCT GCC AAC AAC GTG GTG TAT AAG CAG TAT GAG GAC ATG GTC 336
 Ile Asp Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val
 100 105 110
 GTG GAG TCG TGT GGC TGC AGG 357
 Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg

115

【0026】

配列番号：2

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸

起源：なし

生物名：なし

株名：なし

配列の特徴：MP52成熟型単離用順方向PCRプライマー。

配列：

ATAATGCCAC TAGCAACTCG TCAGGGC 27

【0027】

配列番号：3

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸

起源：なし

生物名：なし

株名：なし

配列の特徴：MP 5 2 成熟型単離用逆方向PCRプライマー。

配列：

CGTCGACTAC CTGCAGCCAC ACGACT 26

【図の簡単な説明】

【図1】

実施例1(2)で得られた本発明のタンパク質の発現ベクター (pKOT245) のプラスミドマップである。

【図2】

実施例4で得られたマウス大腿部の骨・軟骨石灰化組織の軟X線写真である。

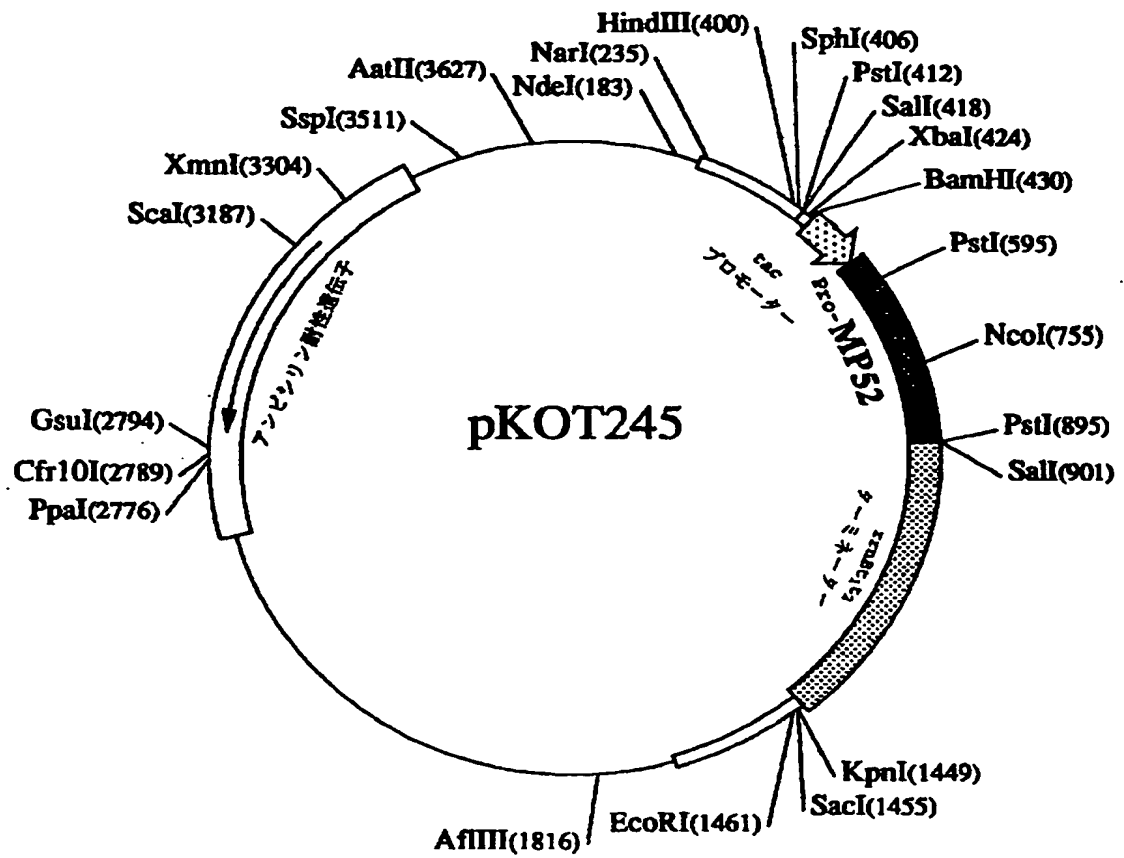
【図3】

実施例4で得られたマウス大腿部の非脱灰切片の組織染色顕微鏡写真である。

【書類名】

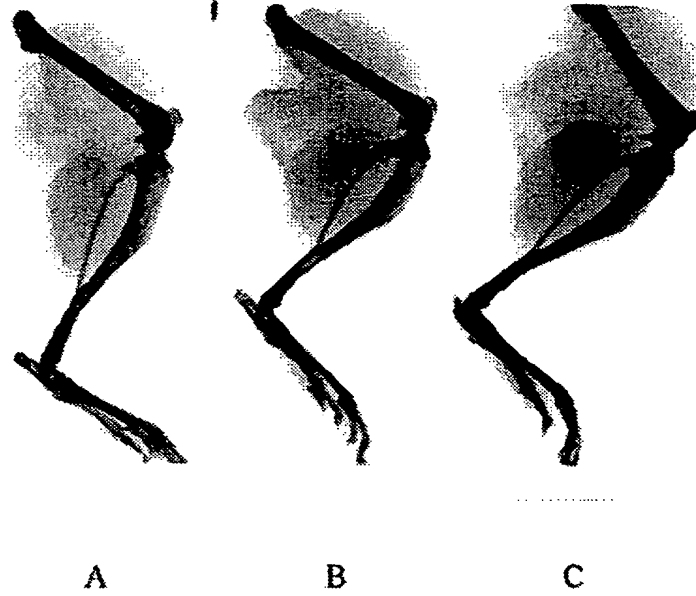
図面

【図1】



【图2】

写真代用面図

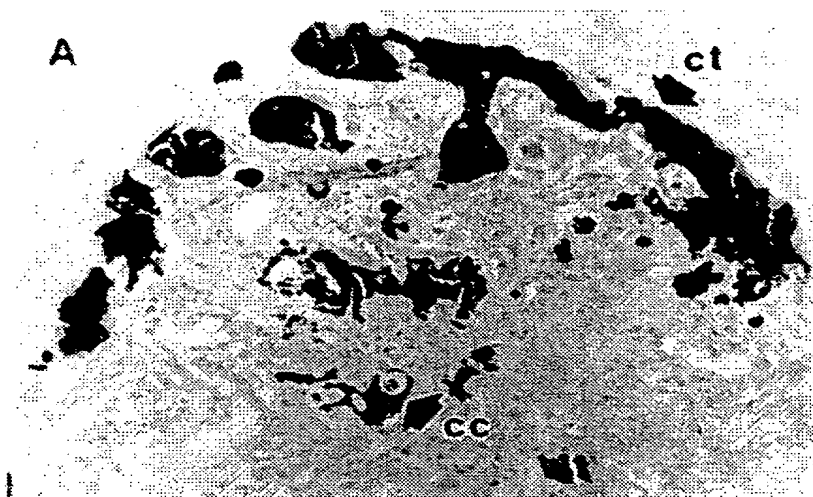


特平 7-322403

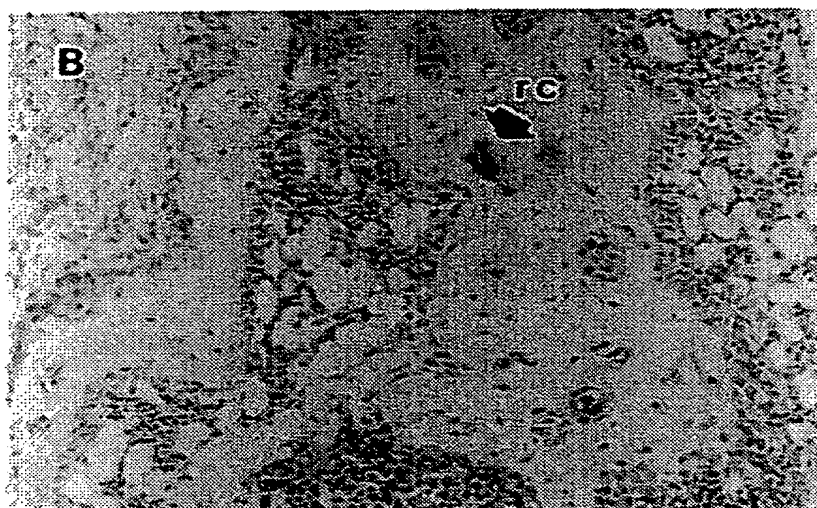
【図3】

図面代用写真

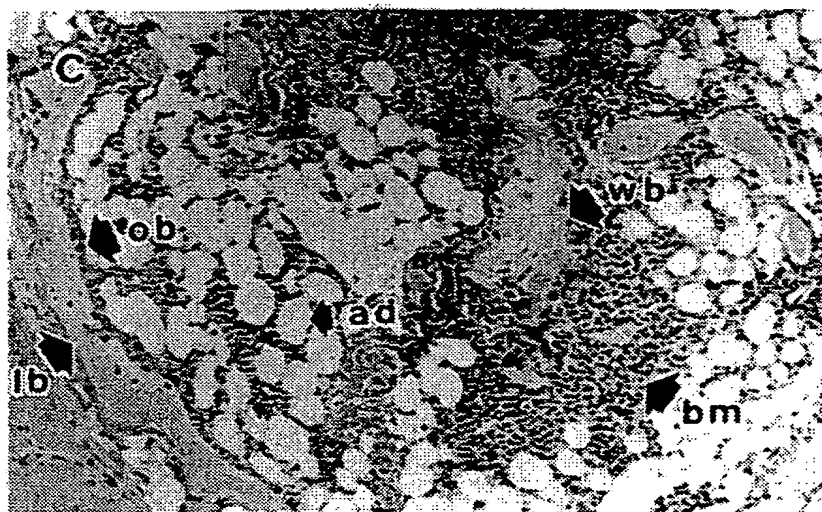
(A)



(B)



(C)



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 骨誘導作用を有し、軟骨・骨疾患治療剤として有用なタンパク質であって、工業的な規模で純粋な形で製造しうるものを提供する。

【解決手段】 ヒトMP52由来の配列表配列番号1記載のアミノ酸配列からなるタンパク質および該タンパク質の二量体。上記アミノ酸配列をコードするDNA配列の5プライム末端にメチオニンをコードするコドンが付加したDNAを含有するプラスミドを構築し、そのプラスミドで大腸菌を形質転換し、その大腸菌を培養することによって得られるインクルージョンボディを可溶化し、精製することによって得られる単量体のタンパク質を二量体に再生し、これを精製することにより上記二量体タンパク質が得られる。

【選択図】 なし



書式 7

受 託 証

通 知 番 号 : 7 生寄文 第 622 号

通 知 年 月 日 : 平成 7 年 4 月 14 日

ヘキストジャパン (株) 医薬研究開発本部
取締役本部長 丸山 博巳

殿

工業技術院生命工学工業技術研究所

鈴木 修



I. 微生物の表示	
<p>(寄託者が付した鑑別のための表示)</p> <p>PKOT245 EK-MP002</p>	<p>(受託番号)</p> <p>FERM P- 14895</p>
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
<p>I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置</p>	
III. 受領及び受託	
<p>当所は、平成 7 年 4 月 14 日に受領した I 欄の微生物を受託する。</p>	

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 000113137
【住所又は居所】 東京都港区赤坂8丁目10番16号
【氏名又は名称】 ヘキストジャパン株式会社
【代理人】 申請人
【識別番号】 100091731
【住所又は居所】 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広洋ビル
すばる特許事務所
【氏名又は名称】 高木 千嘉
【代理人】 申請人
【識別番号】 100087930
【住所又は居所】 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広洋ビル
すばる特許事務所
【氏名又は名称】 佐藤 辰男
【代理人】 申請人
【識別番号】 100080355
【住所又は居所】 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広洋ビル
すばる特許事務所
【氏名又は名称】 西村 公佑
【提出された物件の記事】
【提出物件名】 受託証 1

<項名訂正情報>

【図の簡単な説明】 → 【図面の簡単な説明】

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000113137]

1. 変更年月日	1990年 8月30日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都港区赤坂8丁目10番16号
氏 名	ヘキストジャパン株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)